

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

STIC Translation Branch Request Form for Translation

Phone: 308-0881 Crystal Plaza 3/4, Room 2C15 <http://ptoweb/patents/stic/stic-transhome.htm>

Signature Required for RUSH

Information in shaded areas is required -

Fill out a separate Request Form for each document

U. S. Serial No. : 09/785,761
Requester's Name: Alex Noguera Phone No. : 305-5686
Office Location: CP3-7031 Art Unit/Org. : 1753
Is this for the Board of Patent Appeals? No
Date of Request: 02/24/03
Date Needed By: 04/24/03

(Please indicate a specific date)

Document Identification (Select One):

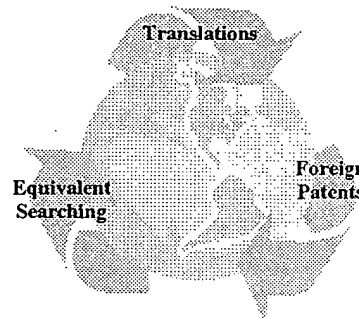
Note: If submitting a request for patent translation, it is not necessary to attach a copy of the document with the request.

If requesting a non-patent translation, please attach a complete, legible copy of the document to be translated to this form and submit it at your EIC or a STIC Library.

1. ☒ Patent Document No. 411216841
Country Code DE
Publication Date 10/15/92
Language DE
No. of Pages _____ (filled by STIC)

2. ☐ Article Author _____
Language _____
Country _____
3. ☐ Other Type of Document _____
Country _____
Language _____

Translations Branch
The world of foreign prior art to you.



To assist us in providing the most cost effective service, please answer these questions:

- > Will you accept an English Language Equivalent? Y (Yes/No)
- > Would you like to review this document with a translator prior to having a complete written translation? (Translator will call you to set up a mutually convenient time) N (Yes/No)
- > Would you like a Human Assisted Machine translation? N (Yes/No)
Human Assisted Machine translations provided by Derwent/Schreiber is the default for Japanese Patents 1993 onwards with an Average 5-day turnaround.

STIC USE ONLY

Copy/Search
Processor: NA
Date assigned: 2-25
Date filled: 2-25
Equivalent found: (Yes/No) Y

Doc. No.: _____
Country: _____

Translation
Date logged in: 2.15.03
PTO estimated words: 1232
Number of pages: 8
In-House Translation Available: _____
In-House: _____
Translator: _____
Assigned: _____
Returned: _____

Contractor:
Name: SC
Priority: E
Sent: 2-26-03
Returned: 3-7-03



PTO 2003-2002
S.T.I.C. Translations Branch





⑨ BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 41 12 168 A 1**

⑤① Int. Cl.⁵:
B01D 57/02
C 07 K 3/14
C 08 L 33/26

⑳ Aktzeichen: P 41 12 168.6
㉑ Anmeldetag: 13. 4. 91
㉒ Offenlegungstag: 15. 10. 92

DE 41 12 168 A 1

㉑ Anmelder:
Serva Feinbiochemica GmbH & Co, 6900 Heidelberg,
DE

㉒ Erfinder:
Balshusemann, Dirk, Dr., 6906 Leimen, DE; Berger,
Beate, 6900 Heidelberg, DE

⑤④ Neue Puffersysteme für die horizontale Gelschicht-Elektrophorese

⑤⑦ Die Erfindung betrifft neue Puffersysteme für die horizontale Gelschicht-Elektrophorese.

PTO 2003-2002
S.T.I.C. Translations Branch

DE 41 12 168 A 1

Die Erfindung betrifft die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen in einem diskontinuierlichen, aus jeweils einem gemeinsamen Sammel- und Trenngel bestehenden System. In dem hier beschriebenen System wird Taurinat als Folgeion und Tris als Gegenion verwendet. Das Leitmedium wird aus einer Reihe von Anionen gewählt (z. B. Chlorid, Sulfat, Acetat, Phosphat).

Vorzugsweise wird die Elektrophorese als SDS-Elektrophorese unter Zusatz von Natriumdodecylsulfat (SDS) durchgeführt.

Zur elektrophoretischen Proteintrennung sind bereits eine Vielzahl kontinuierlicher und diskontinuierlicher Systeme beschrieben worden. Diskontinuierliche Systeme konzentrieren die wäßrigen Proben innerhalb einer sogenannten Sammelzone, bevor die eigentliche Auftrennung der Proteine in der Trennzone stattfindet. Durch die Konzentrierung werden schärfere Proteinbanden erzeugt als in kontinuierlichen Systemen. Die Diskontinuität kann sich auf Pufferzusammensetzung, pH-Wert und Gelstärke beziehen; das im folgenden dargestellte System ist in bezug auf alle drei Parameter diskontinuierlich.

Das hier beschriebene Elektrophoresesystem ist dadurch gekennzeichnet, daß die Trennung in einer 0,1–1,0 mm, vorzugsweise 0,5 mm dicken Gelschicht aus Polyacrylamid durchgeführt wird.

Die Polyacrylamidschicht ist fest mit einer hydrophil gemachten Trägerfolie oder einem netzartigen Gewebe verbunden und erhält dadurch mechanische Stabilität.

Solche netzartigen Gewebe sind beispielsweise in der deutschen Offenlegungsschrift 37 36 087 offenbart, auf die hiermit inhaltlich Bezug genommen wird.

Die Trennzone weist eine Polyacrylamidkonzentration von 7–20% g/v auf, die Sammelzone von 4–5% g/v, vorzugsweise 5 Gew.-%. Der Anteil an Quervernetzer, z. B. N,N'-Methylenbisacrylamid, am Gesamtacrylamid beträgt 0,5–5%, vorzugsweise 4 Gew.-%. Die beanspruchten Konzentrationen, soweit sie in g/v (Gewicht/Volumen) angegeben sind, errechnen sich aus dem Gewicht in Gramm bezogen auf das Gesamtvolumen angegeben in ml.

Sowohl Sammel- als auch Trenngel enthalten Glycerin oder Saccharose zwischen 5 und 40% g/v, vorzugsweise 30% g/v (Sammelgel) bzw. 10% (Trenngel).

Das in Trenn- und Sammelgel identische Puffersystem besteht aus 0,1–0,5 mol/l, vorzugsweise 0,25 mol/l Tris (Tris(hydroxymethyl)aminomethan) wobei der pH-Wert 7,2–8,4, vorzugsweise 7,5, mit der Säure des gewünschten Anions eingestellt wird.

Zusätzlich enthalten Trenn- und Sammelgel bei der SDS-Elektrophorese noch 0,04–0,1 Gew.-%, vorzugsweise 0,06% SDS.

Der Kathoden-Puffer besteht aus 0,1–0,5 mol/l, vorzugsweise 0,25 mol/l Tris, 0,2–0,7 mol/l, vorzugsweise 0,5 mol/l Taurin mit einem pH-Wert von 8–9, vorzugsweise 8,5.

Der Anodenpuffer besteht wie im Trenn- und Sammelgel aus Tris und dem jeweils gewählten Anion, bei gleichem pH-Wert wird die Konzentration des Puffers 2,5fach im Vergleich zur Gelplatte eingestellt.

Bei der SDS-Elektrophorese enthalten Kathoden- und Anodenpuffer 0,1–1,0 Gew.-%, vorzugsweise 0,2% SDS. Anoden- und Kathodenpuffer werden vorzugsweise in Form von mit dem jeweiligen Puffer getränkten Blöcken aus Cellulose- oder Glasfaserpapier zwischen die Gelplatte und die Elektroden platiert. In diesem Fall

werden die Puffer mit einem Gehalt von 30% Glycerin zur Erhöhung der Viskosität hergestellt. Dadurch wird der unbeabsichtigte Austritt der Pufferflüssigkeiten aus den Papierblöcken verhindert. In einer anderen Ausführungsform werden spezielle Gelstreifen, die ebenfalls die Pufferflüssigkeit enthalten, zur Stromzuführung verwendet. Diese Technik ist beispielsweise in der PCT-Anmeldung WO 87/04 948 beschrieben.

Alternativ können die Puffer auch als freie Lösungen in Pufferreservoirs eingesetzt werden. Die Verbindung zur Gelplatte wird dann durch puffergetränkte dünne Papierstreifen hergestellt. In diesem Fall wird auf den Glycerinzusatz verzichtet.

Das Aufbringen der Proben – der zu trennenden Proteine – erfolgt direkt auf das Sammelgel nach an sich bekannten Methoden.

Die elektrophoretische Trennung der Proteine wird durch Anlegen eines Gleichstroms bei einer Spannung von 10–50 V/cm in 1,5–2 h durchgeführt.

Das erfindungsgemäße Verfahren unter Verwendung des beanspruchten Puffersystems ermöglicht eine wesentlich höhere Auflösung der Banden, als dies bei der Verwendung bisher aus dem Stand der Technik bekannter Puffersysteme möglich ist.

Die Fixierung und Färbung der getrennten Proteinbanden erfolgt in an sich bekannter Weise z. B. mit Serva Blau R, Serva Violett 17 oder durch Silberfärbung.

Das nachfolgende Beispiel soll die Erfindung erläutern, ohne sie jedoch einzuschränken. Die Herstellung der Gelplatten ist an sich bekannt, wie es z. B. bei Görg, A., Postel, W., Westermeier, R., Gianazza, Righetti, P. G. (1980) J. Biochem. Biophys. Methode 3, 273–284 beschrieben ist.

Beispiel 1

Zusammensetzung eines horizontalen SDS-Gels

Sammelgel (5% Polyacrylamid, pH 6,7)
4,8 g/100 ml Acrylamid
0,2 g/100 ml N,N'-Methylenbisacrylamid
0,25 M Tris
0,20 M HCl
0,06 g/100 ml SDS
30 g/100 ml Glycerin

Trenngel (14% Polyacrylamid, pH 7,6)
13,44 g/100 ml Acrylamid
0,56 g/100 ml N,N'-Methylenbisacrylamid
0,25 M Tris
0,2 M HCl
0,06 g/100 ml SDS
10 g/100 ml Glycerin

Kathodenpuffer (pH 8,5)
0,38 M Tris
0,5 M Taurin
0,2 g/100 ml SDS
30 g/100 ml Glycerin

Anodenpuffer (pH 7,6)
0,625 M Tris
0,5 M HCl
0,2 g/100 ml SDS
30 g/100 ml Glycerin

Patentansprüche

1. Polyacrylamidgel für die horizontale Elektrophorese, enthaltend ein Puffersystem, das Taurinat als Folgeion und Tris als Gegenion enthält, dadurch gekennzeichnet, daß das Leitton aus der Gruppe Chlorid, Sulfat, Acetat oder Phosphat ausgewählt ist. 5
2. Polyacrylamidgel nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es aus einem Trenn- und einem Sammelgel besteht. 10
3. Polyacrylamidgel nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Konzentration an Tris 0,1 – 0,5 mol/l im Puffersystem beträgt.
4. Polyacrylamidgel für die horizontale Elektrophorese, enthaltend ein Puffersystem, das Tris als Gegenion und ein Anion aus der Gruppe Chlorid, Sulfat, Acetat oder Phosphat enthält, wobei der pH-Wert zwischen 7,2 und 7,8 eingestellt ist. 15
5. Pufferlösung für die Elektrophorese enthaltend Tris und Taurin, wobei der pH-Wert zwischen 8,2 und 8,7 beträgt. 20
6. Pufferlösung für die Elektrophorese enthaltend Tris, wobei der pH-Wert zwischen 7,2 und 7,8 eingestellt ist. 25
7. Verfahren zur elektrolitischen Auftrennung von Proteinen, dadurch gekennzeichnet, daß ein diskontinuierliches System aus einem homogenen Sammel- und Trenngel unter Verwendung eines Puffersystems, das Taurin als Folgeion, Tris als Gegenion und als Leitton ein Anion aus der Gruppe Chlorid, Sulfat, Acetat und Phosphat enthält, verwendet wird. 30

35

40

45

50

55

60

65

— Leerseite —

PTO 03-2002

German Patent

Document No. DE 41 12 168 A1

NEW PUFFER SYSTEMS FOR HORIZONTAL GEL LAYER ELECTROPHORESIS

[Neue Puffersysteme fuer the horizontale Gelschicht-
Elektrophorese]

Dirk Balshuesemann

UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Washington, D.C.

March 2003

Translated by: Schreiber Translations, Inc.

<u>Country</u>	:	Federal Republic of Germany
<u>Document No.</u>	:	DE 41 12 168 A1
<u>Document Type</u>	:	Document laid open (first publication without search report)
<u>Language</u>	:	German
<u>Inventor</u>	:	Dirk Balshuesemann
<u>Applicant</u>	:	Serva Feinbiochemica LLC & Co., Heidelberg, Federal Republic of Germany
<u>IPC</u>	:	B01D 57/02
<u>Application Date</u>	:	April 13, 1991
<u>Publication Date</u>	:	October 15, 1992
<u>Foreign Language Title</u>	:	Neue Puffersysteme fuer the horizontale Gelschicht- Elektrophorese
<u>English Title</u>	:	NEW PUFFER SYSTEMS FOR HORIZONTAL GEL LAYER ELECTROPHORESIS

New Puffer Systems for Horizontal Gel Layer Electrophoresis

The invention concerns new puffer systems for horizontal gel layer electrophoresis.

Description

The invention concerns the electrophoretic separation of proteins in a discontinuous system consisting of correspondingly homogeneous collecting and separating gel. In the system described herein is used taurinate as sequence ion and tris as counter-ion. The conductive ion is selected from a series of anions (for example, chloride, sulfate, acetate, phosphate).

The electrophoresis is preferably carried out as SDS electrophoresis by using sodium dodecyl sulfate (SDS).

For the electrophoretic separation have already been described a variety of continuous and discontinuous systems. Discontinuous systems concentrate the aqueous samples within a so-called collecting zone before the actual separation of the proteins takes place in the separating zone. By way of the concentration were produced sharper protein zones than in the continuous systems. The discontinuity can refer to the puffer

¹ Numbers in the margin indicate pagination in the foreign text.

composition, pH value, and gel thickness; the system described below is discontinuous with respect to all three parameters.

The electrophoresis described herein is characterized in that the separation is carried out in a 0.1-1.0 mm, preferably 0.5 mm thick gel layer of polyacrylamide.

The polyacrylamide layer is fixedly connected to a hydrophilically made carrier film or a reticular weave and is provided in this way with a mechanical stability.

The separating zone has a polyacrylamide concentration of 7-20% g/v, the collecting zone of 4-5% g/v, preferably 5% by weight. The proportion of cross-linking agent, for example, N,N'-methylene bisacrylamide, to total acrylamide amounts to between 0.5 and 5%, preferably 4% by weight. The required concentrations, insofar as they are indicated in g/v (weight/volume), are calculated from the weight in grams with respect to the total volume indicated in ml.

The collecting gel as well as the separating gel contain glycerin or saccharose at 5 to 40% g/v, preferably 30% g/v (collecting gel) or 10% (separating gel).

The puffer system, which is identical in the separating and collecting gel consists of 0.1-0.5 mmol/l, preferably 0.25 mol/l tris (tris(hydroxymethyl)aminomethane), while the pH value is

adjusted to 7.2-8.4, preferably 7.5, with the acid of the desired anions.

During the SDS electrophoresis, the separating and collecting gels also contain 0.04-0.1% by weight, preferably 0.06% SDS.

The cathode puffer consists of 0.1-0.5 mol/l, preferably 0.25 mol/l tris, 0.2-0.7 mol/l, preferably 0.5 mol/l taurine with a pH value of 8-9, preferably 8.5.

The anode puffer consists like in the separating and collecting gel of tris and the correspondingly selected anion; with the same pH value, the concentration of the puffer is adjusted to 2.5 times in comparison with the gel plate.

During the SDS electrophoresis, the cathode and anode puffer contain 0.1-1.0% by weight, preferably 0.2% SDS. The anode and cathode puffer are preferably placed in the form of blocks of cellulose or glass fiber paper soaked with the corresponding puffer between the gel plate and the electrodes. In this case, the puffer is produced with a content of 30% glycerin to increase the viscosity. In this way is prevented the unintentional escape of puffer fluids from the paper blocks. Special gel strips, which also contain the puffer fluid, are used in another embodiment for electrical supply. This technique is described, for example, in the PCT application WO 87/04 948.

As an alternative, the puffers can also be used as free solutions in the puffer reservoir. The connection to the gel plate is then produced by puffer-soaked thin paper strips. In this case, the glycerin addition is omitted.

The application of samples (of the proteins to be separated) takes place directly on the collecting gel according to methods that are already known.

The electrophoretic separation of the protein is carried out by applying a direct current with a voltage of 10-50 V/cm within 1.5-2 hours.

The process of the invention that uses the claimed puffer systems makes possible an essentially higher resolution of the bands than was possible until now in the state of the art when known puffer systems were used.

The fixation and coloring of the separated protein bands takes place in a known manner, for example, with Serva Blue R, Serva Violet 17, or by silver coloring.

The following example should explain the invention, but not limit the same. The production of the gel plates is already known, as described, for example, by Goerg, A., Postel, W., Westermeier, R., Gianazza, Righetti, P.G. (1980) J. Biochem. Biophys. Method 3, 273-284.

Example 1

Composition of a Horizontal SDS Gel

Collecting gel (5% polyacrylamide, pH 6.7)

4.8 g/100 ml acrylamide

0.2 g/100 ml N,N'-methylene bisacrylamide

0.25 M tris

0.02 M HCl

0.06 g/100 ml SDS

30 g/100 ml glycerin

Separating gel (14% polyacrylamide, pH 7.6)

13.44 g/100 ml acrylamide

0.56 g/100 ml N,N'-methylene bisacrylamide

0.25 M tris

0.2 M HCl

0.06 g/100 ml SDS

10 g/100 ml glycerin

Cathode puffer (pH 8.5)

0.38 M tris

0.5 M taurine

0.2 g/100 ml SDS

30 g/100 ml glycerin

Anode puffer (pH 7.6)

0.625 M tris

0.5 M HCl

0.2 g/100 ml SDS

30 g/100 ml glycerin

/3

Patent Claims

1. A polyacrylamide gel for horizontal electrophoresis, containing a puffer system that contains taurinate as sequence ion and tris as counter ion, characterized in that the conducting ion is selected from the group of chloride, sulfate, acetate, or phosphate.
2. The polyacrylamide gel of claim 1, which consists of a separating and a collecting gel.
3. The polyacrylamide gel of claim 1 or 2, wherein the concentration of tris in the puffer system amounts to between 0.1 and 0.5 mol/l.
4. The polyacrylamide gel for horizontal electrophoresis, containing a puffer system that contains tris as counter ion and an anion of the group of chloride, sulfate, acetate, or phosphate, wherein the pH value is adjusted to between 7.2 and 7.8.
5. A puffer solution for electrophoresis containing tris and taurine, wherein the pH value amounts to between 8.2 and 8.7.

6. A puffer solution for electrophoresis containing tris, wherein the pH value is adjusted to between 7.2 and 7.8.
7. A process for electrolytic separation of proteins, wherein a discontinuous system of a homogeneous collecting and separating gel by using a puffer system that contains taurine is used as sequencé ion, tris is used as counter ion, and as conducting ion is used an anion of the group of chloride, sulfate, acetate, and phosphates.

/4

- Blank Page -